4 – Mikrofotografie

Fotodokumentace:
zásady, problémy, chyby

Fotografická dokumentace

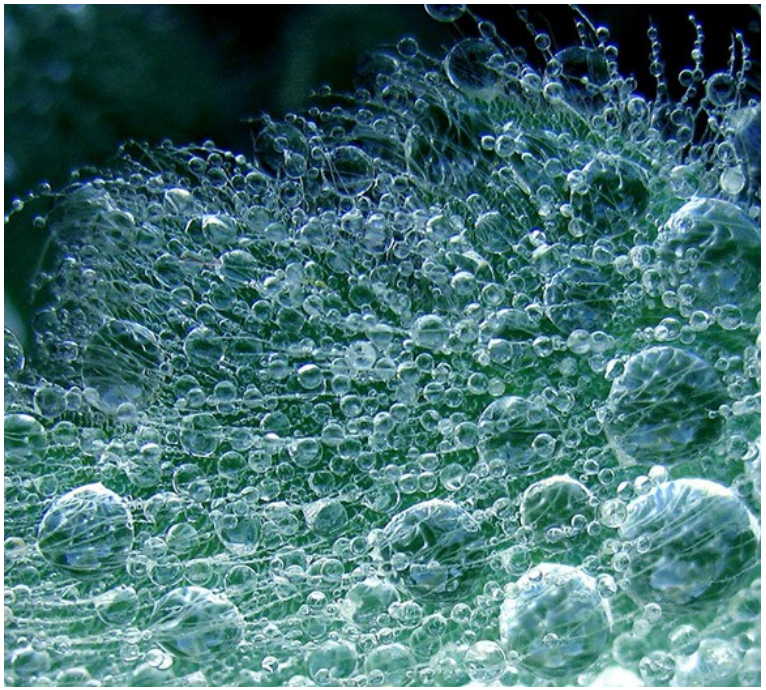
- nejčastější způsob dokumentace
- dokumentární fotografie podle velikosti objektů: **fotografie, makrofotografie a mikrofotografie**
- rozvoj digitálních technologií a digitálních fotoaparátů: digitální fotografie, digitální makrofotografie a digitální mikrofotografie

Makrofotografie

- je fotografický postup, kterým získáme snímek podávající více podrobností předmětu, než jich na něm rozezná lidské oko ze vzdálenosti 25cm
- snímek zvětšený v měřítku 1:1 až 30:1

Makrofotografie

- Např.: snímek 2 cm velkého brouka bude mít při měřítku 1:1 na snímači či filmu rozměr 2 cm, takže velikost onoho předmětu na snímači či filmu odpovídá jeho skutečné velikosti.
- **Při zvětšení nad 30:1** hovoříme o **mikrofotografii**.



Inspirace na makrofoto: http://www.better-photographs.com/macro-photography.html

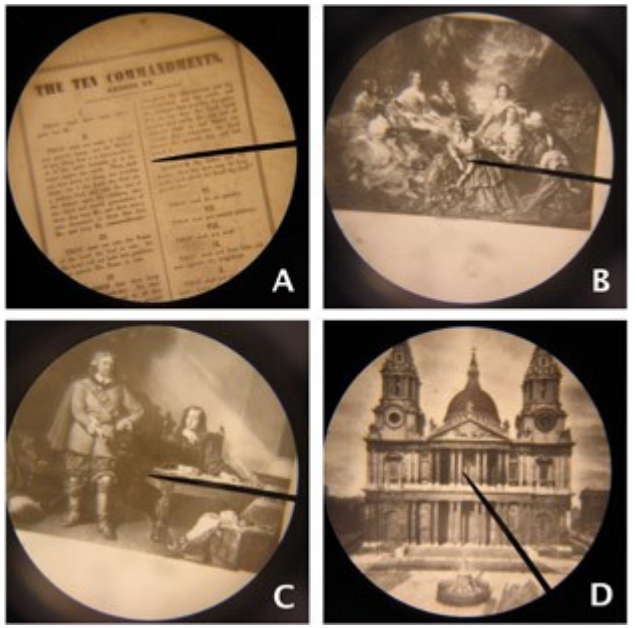
Mikrofotografie

- snímky obrazů mikroskopických a submikroskopických objektů
- Pořízené - zvětšovacími zařízeními, nejčastěji nejrůznějšími typy mikroskopů (*fotomikroskopie*)
- uplatnění: geologie, biologie, výtvarné umění

Průkopník: německý lékař Robert Koch, v 70. letech 19. století využil mikrofotografii při výzkumu anthraxu

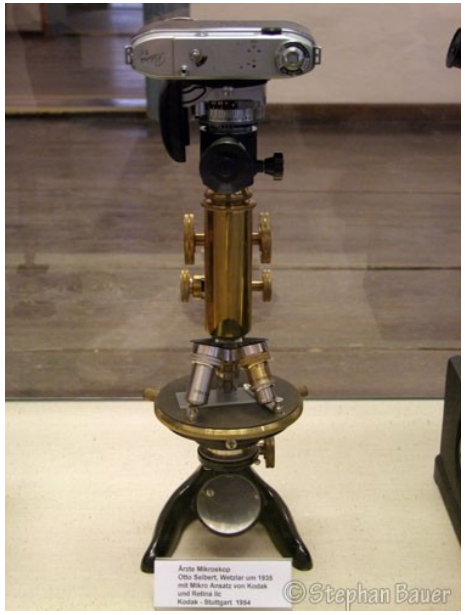
Poznámka – photomicrography vs. mikrophotography

- Anglické výrazy: **light micrograph** or **photomicrograph**
- **Microphotograph -** něco jiného (fotografie zmenšené do mikroskopického měřítka, speciální mikrofilmy)



Jak na fotomikroskopii

- Mikroskop + fotoaparát

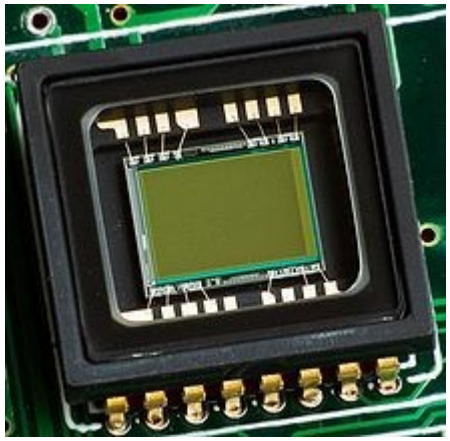


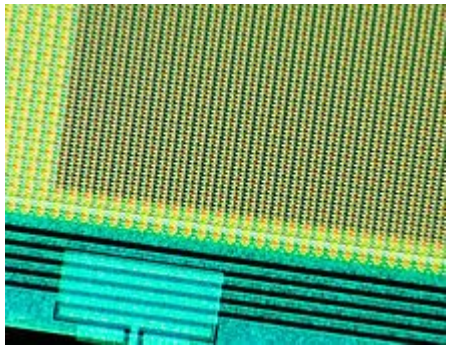
- Mikroskop + CCD kamera

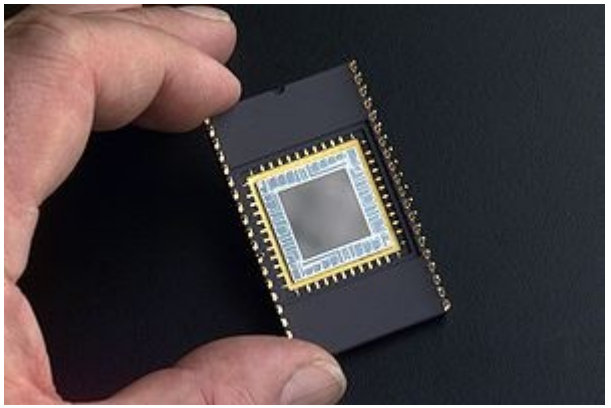
Nouzovka: LCD mikroskopy

CCD KAMERA

- CCD (=Charge Coupled Device): polovodičový prvek, který umožňuje snímat obraz a ukládat ho v digitální formě
- skládá se z velkého počtu světlocitlivých pixelů, které se dopadem světla nabíjí. Velikost náboje je úměrná intenzitě dopadajícího světla.
- technologický nástupce fotografických nástavců pro zhotovování mikrofotografií







Fotografická dokumentace pro odborné účely

- charakter objektivního zachycení objektů bez úpravy výsledku
- pravdivé zachycení skutečnosti
- srozumitelnost a stručnost vyjádření (promyšlené zachycení probíhajících dějů)

Fotografická dokumentace pro výukové účely

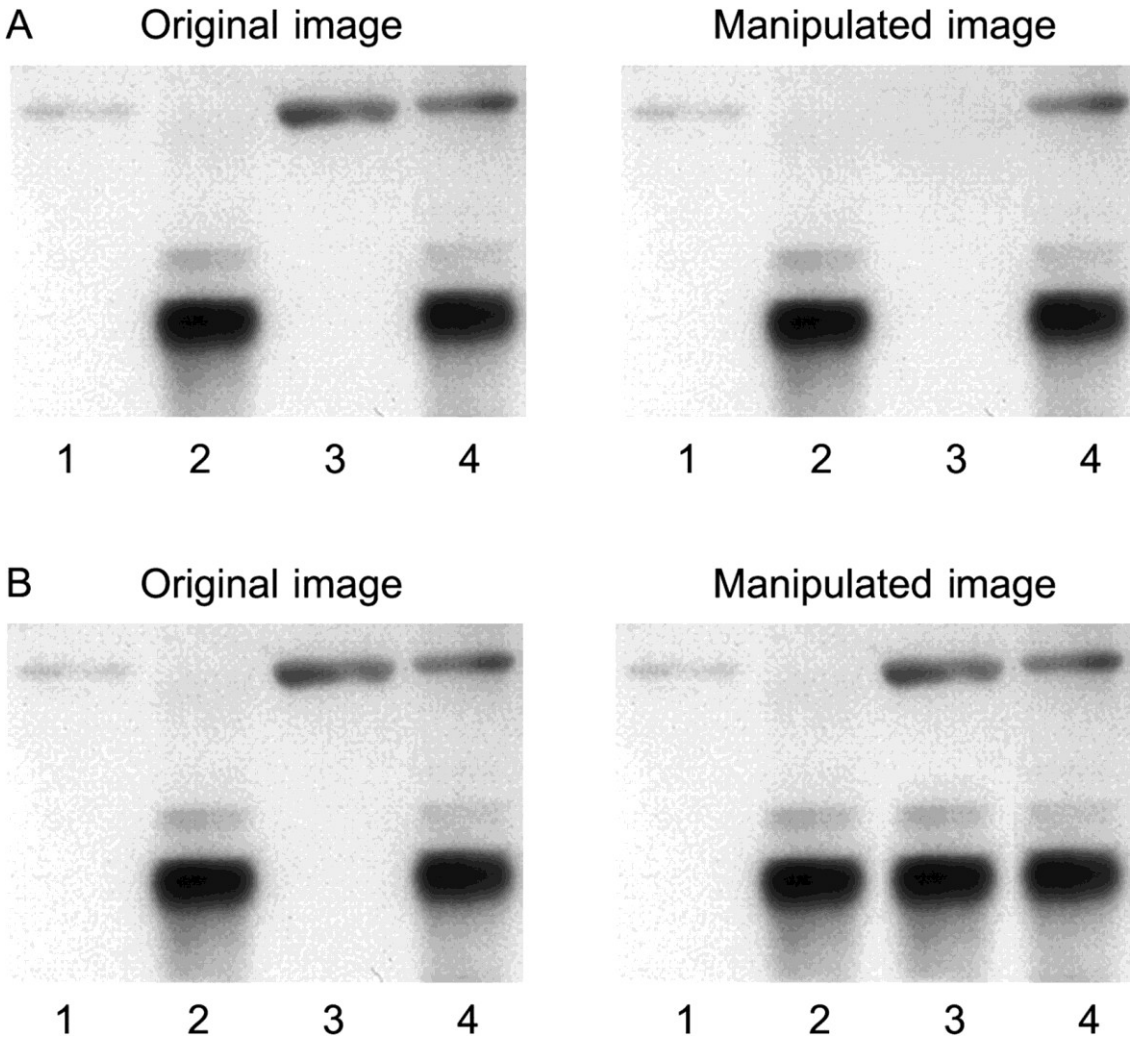
- Fotografie jako výuková pomůcka
- Použití hlavně: dokumentace chráněných a cizokrajných organismů, částí organismů (např. u rostlin, nelze demonstrovat najednou květy, plody atd.), k demonstraci malých organismů, demonstraci detailů (makrofotografie a mikrofotografie), k dokumentaci pracovního postupu

Falzifikace fotodokumentace

- Falzifikací rozumíme padělání původních údajů a následné publikování zkreslených nebo vymyšlených informací.

http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/30767/title/St--Jude-postdoc-faked-images/ :

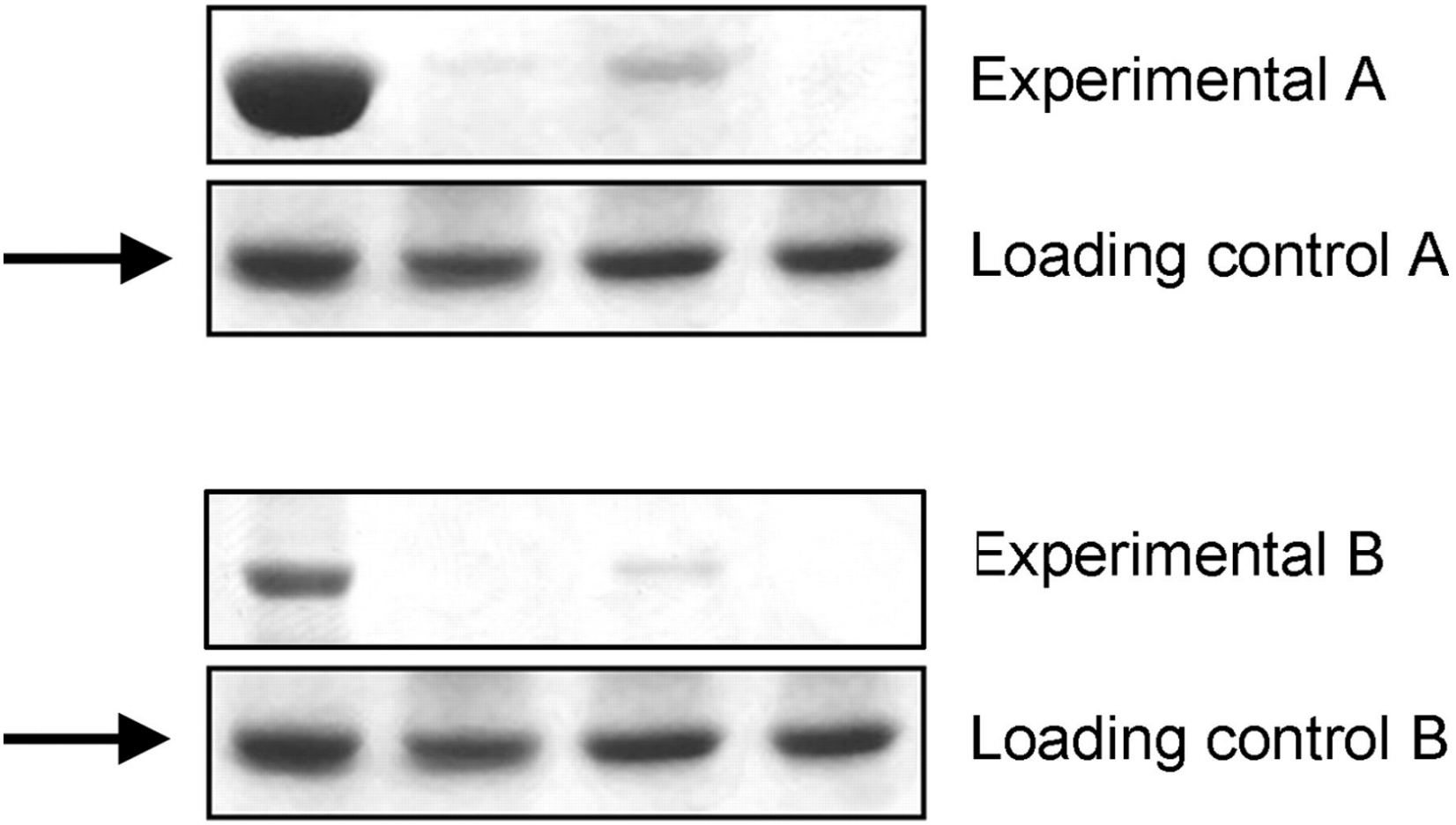
Gross manipulation of blots.



Rossner M , Yamada K M J Cell Biol 2004;166:11-15

© 2004 Rockefeller University Press

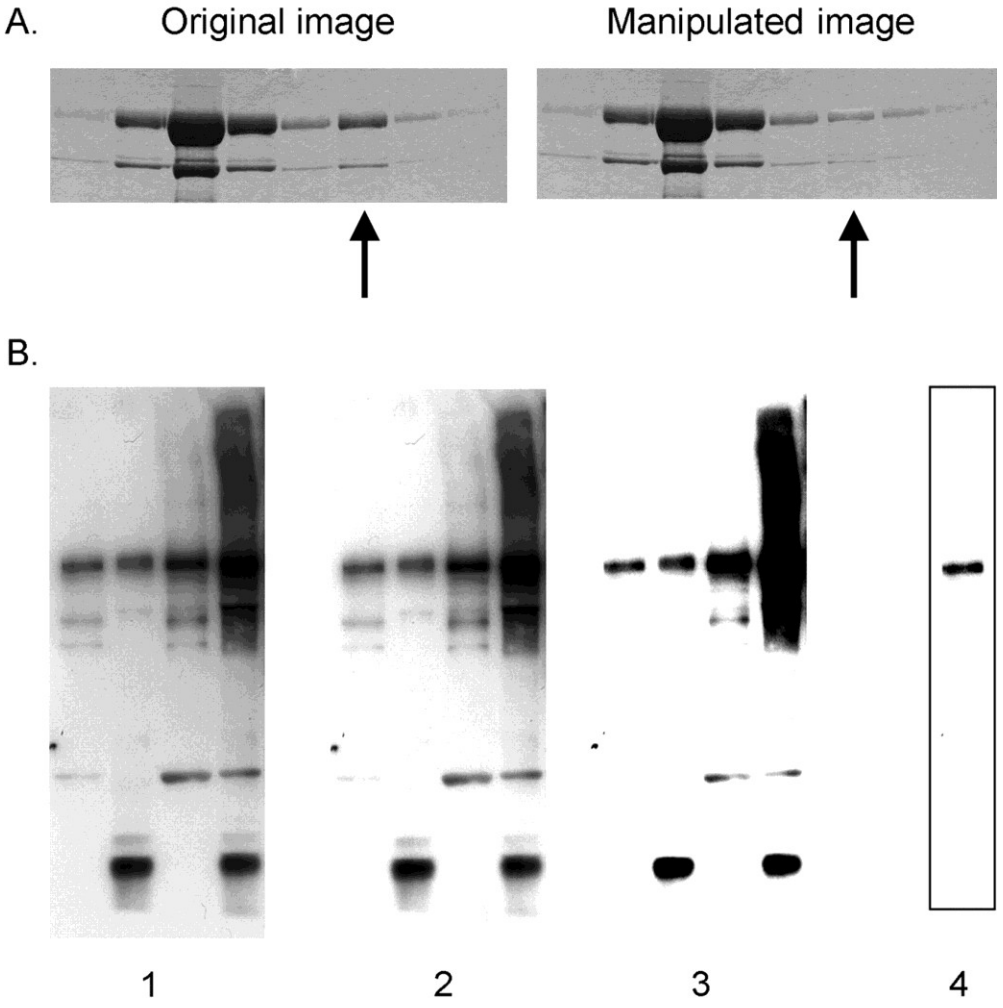
Gross manipulation of blots.



Rossner M , Yamada K M J Cell Biol 2004;166:11-15

© 2004 Rockefeller University Press

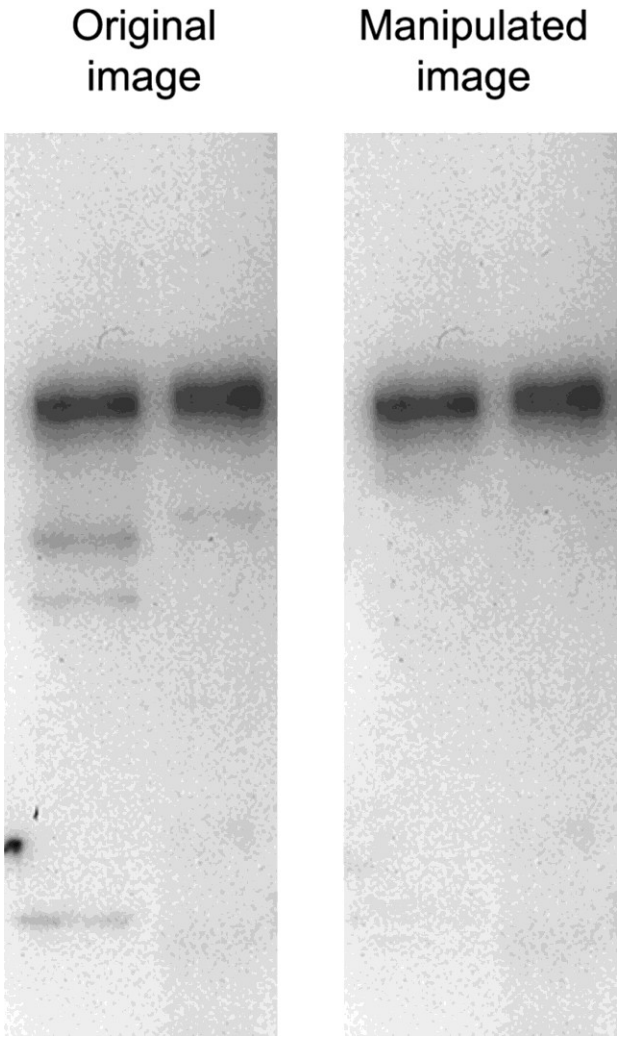
Manipulation of blots: brightness and contrast adjustments.



Rossner M , Yamada K M J Cell Biol 2004;166:11-15

© 2004 Rockefeller University Press

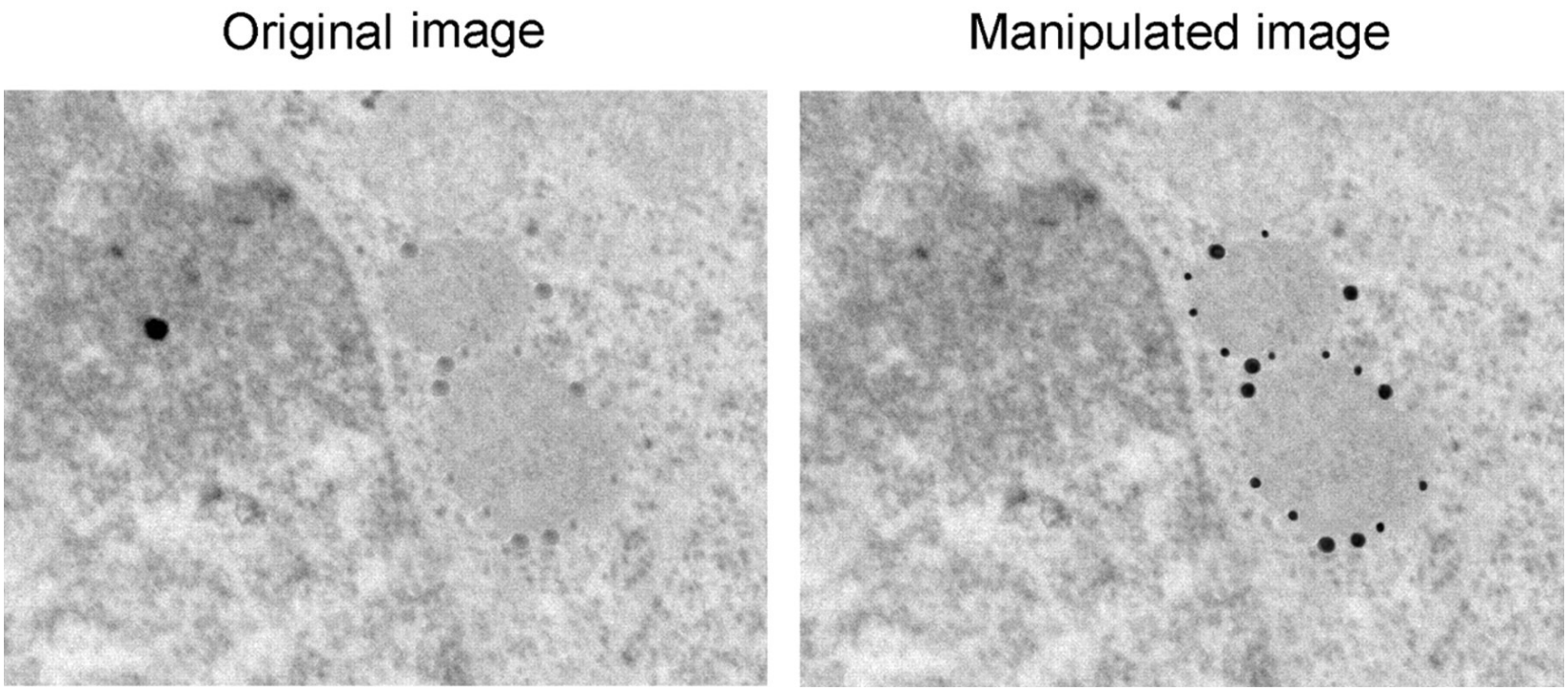
Manipulation of blots: cleaning up background.



Rossner M , Yamada K M J Cell Biol 2004;166:11-15

© 2004 Rockefeller University Press

Misrepresentation of immunogold data.

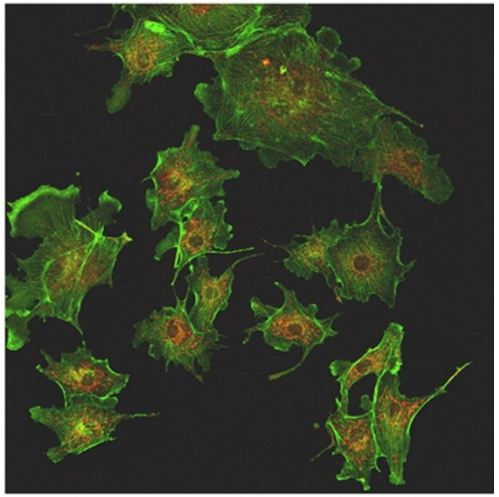


Rossner M , Yamada K M J Cell Biol 2004;166:11-15

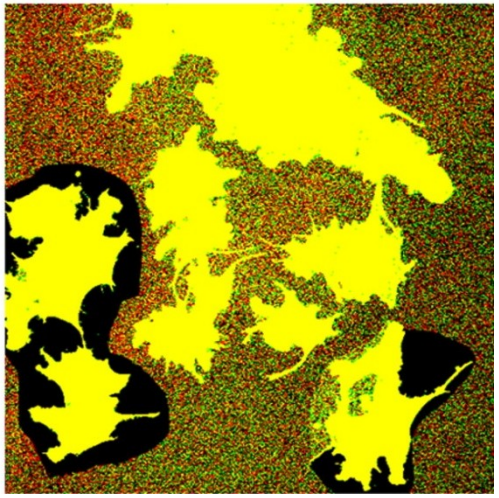
© 2004 Rockefeller University Press

Misrepresentation of image data.

Manipulated image



Manipulation revealed by contrast adjustment



Rossner M , Yamada K M J Cell Biol 2004;166:11-15

© 2004 Rockefeller University Press

Použitá literatura

http://swehsc.pharmacy.arizona.edu/exppath/micro/digimage_ethics.php

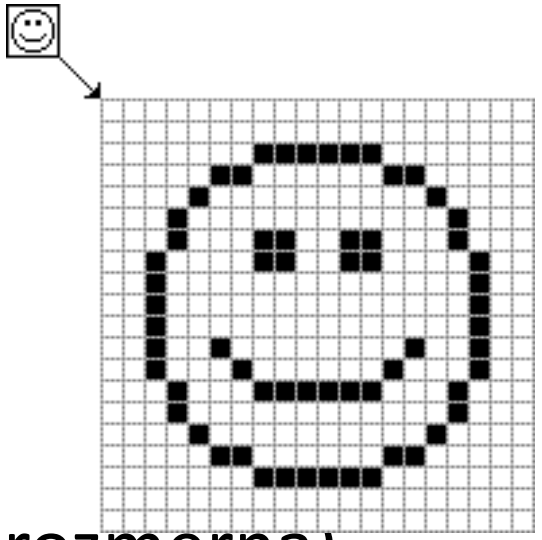
- What's in a picture? The temptation of image manipulation (2004) M. Rossner and K. M. Yamada, J. Cell Biology 166 (1):11–15.
- CSI: Cell Biology. (2005) Pearson, H., Nature 434: 952-953.
- Beautification and fraud. (2006) Editorial, Nature Cell Biol. 8: 101-102.
- Appreciating data: warts, wrinkles and all. (2006) Editorial, Nature Cell Biol. 8: 203. Not Picture Perfect. (2006) Editorial, Nature 439: 891-892.
- Don't Pretty up that Picture just yet. (2006) Couzin, J., Science 314: 1866-1868.

- Seeing the Scientific Image (parts 1,2,3), John Russ, Proceedings Royal Microscopy Society 39(2); 39(3); 39(4) (2004).
- Ethics and Digital Imaging, J.M. MacKenzie, M.G. Burke, T. Carvalho & A. Eades. Microscopy Today 12:40-41. (2006)
- Crusade for Publishing Better Light Micrographs – Light Microscopy publication guidelines, George McNamara
- The 39 Steps: A Cautionary Tale of Quantitative 3-D Fluorescence Microscopy, James Pawley, BioTechniques 28(5): 884-887 (2000).
- Seeing is believing? A beginners' guide to practical pitfalls in image acquisition, Allison J. North, JCB 172(1): 9-18. (2006)
- Multicolor imaging: the important question of co-localization, Anna Smallcombe, Biotechniques 30, 1240-1242 (2001). ***free registration required***
- Scientific and Industrial, Joint Photographic Experts Group
- The JCB will let your data shine in RGB, Mike Rossner and Rob O'Donnell, Journal of Cell Biology 164:11-13. (2004)
- Digital Image Sampling Frequency, Spring, K.R., Russ, J.C., Parry-Hill, M.J., Fellers, T.J., Zuckerman, L.D. & Davidson, M.W. (2006)

Další materiály ke čtení

- Phototruth or Photofiction?, Thomas Wheeler, published by Lawrence Erlbaum Associates, Mahwah, New Jersey, 2002.
- Ethics in the Age of Digital Photography, J. Long, (National Press Photographer's Association, September 1999)
- Photographs that lie: Welcome to journalism's newest ethical nightmare: digital enhancement, J.D. Lasica (Washington Journalism Review, June 1989)
- Photography in the Age of Falsification, K. Brower, Atlantic Monthly, May 1998 (*this content is now only available to subscribers*)
- Every Picture can tell a Lie, D. Shenk, (Wired News, 1997)
- Ethics in the Age of Digital Photography, J. Long, National Press Photographer's Association, September 1999.
- Digital Tampering in the Media, Politics and Law, Dartmouth University

Základní definice



- Pixel: picture element,
  obrazový prvek
  někdy též pel
  zkracováno na px
  nejmenší jednotka (bezrozmerna) digitální rastrové (bitmapové) grafiky.

  Představuje jeden svítící bod na monitoru, resp. jeden bod obrázku zadaný svou barvou

Obrazové formáty

- Rastrové (bitmapové)
- Vektorové

  - Např. pdf kombinuje oba
  - Do přečtení a interpretace pomocí patřičného SW (schopného převodu matematických zákonitostí na vektory) je každý obrázek rastrový

Vektorové formáty

- Typy souborů: .drw (vector file), .pif (vector image GDF format), .pct (Macintosh bitmap graphics format) , .ps (Adobe PostScript), .eps (Encapsulated PostScript), .svf (Simple Vector Format)

  - Adobe Illustrator: .ai, .ait, .art
  - Corel Draw: .cdr, .cdrw, .cdt
  - Corel: pat (Paint Shop Pro Pattern Image)
  - Digital Line Graph: .dlg, .do
  - OpenOffice: .odg

Rastrové formáty

- Typy souborů: .jpg (JPEG raster format), .gif (GIF transparent file), .png (Portanble Network Graphic Transparent file), .tiff or .tif (Tag Interleave Format)

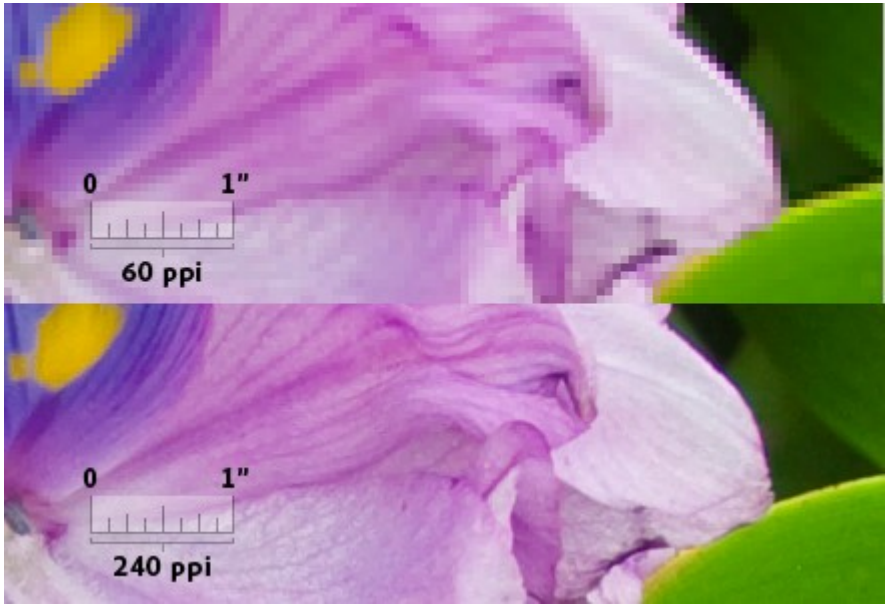
  – Adobe Photoshop: .psd

Co je digitální obraz a jeho charakteristiky

- **Rozlišení**
- **Barevná hloubka**
- **komprese**

Co je digitální obraz a jeho charakteristiky

- **rozlišení:** udává kolik bodů vodorovně a kolik bodů (pixelů) svisle, je schopen fotoaparát



Digitální obrazy se měří **počtem pixelů na palec** (pixels per inch = ppi).
DPI udává, kolik je bodů na jednotce délky o rozměru jednoho palce.
Pro tisk, je rozlišení DPI.
„Dots per inch = Body na palec“ je paramter, který nám udává kvalitu obrazu a výslednou velikost tisknutého objektu.
Čím vyšší rozlišení, tím větší velikost souboru.

Rozlišení

- Např. 300 DPI
  - znamená, že na délce 2,54 cm je 300 bodů
  - tato hodnota často vyžadována časopisy
- Výpočet DPI se využívá pro spočtení nejmenšího možného rozlišení obrázku, který budeme chtít vytisknout, aby na něm nebylo vidět rozmazání okrajů nebo příliš velké množství kostiček
- Kolik pixelů by měl mít obrázek 10x 5 cm:

Nejdříve převod na palce:

$10\ cm \div 2{,}54\ cm = 3{,}94\ palce$

$5\ cm \div 2{,}54\ cm = 1{,}97\ palce$

Potom dopočítáme rozlišení při minimální kvalitě pro tisk 300 *DPI*

$3{,}94\ palce \times 300\ DPI = 1.180\ px$

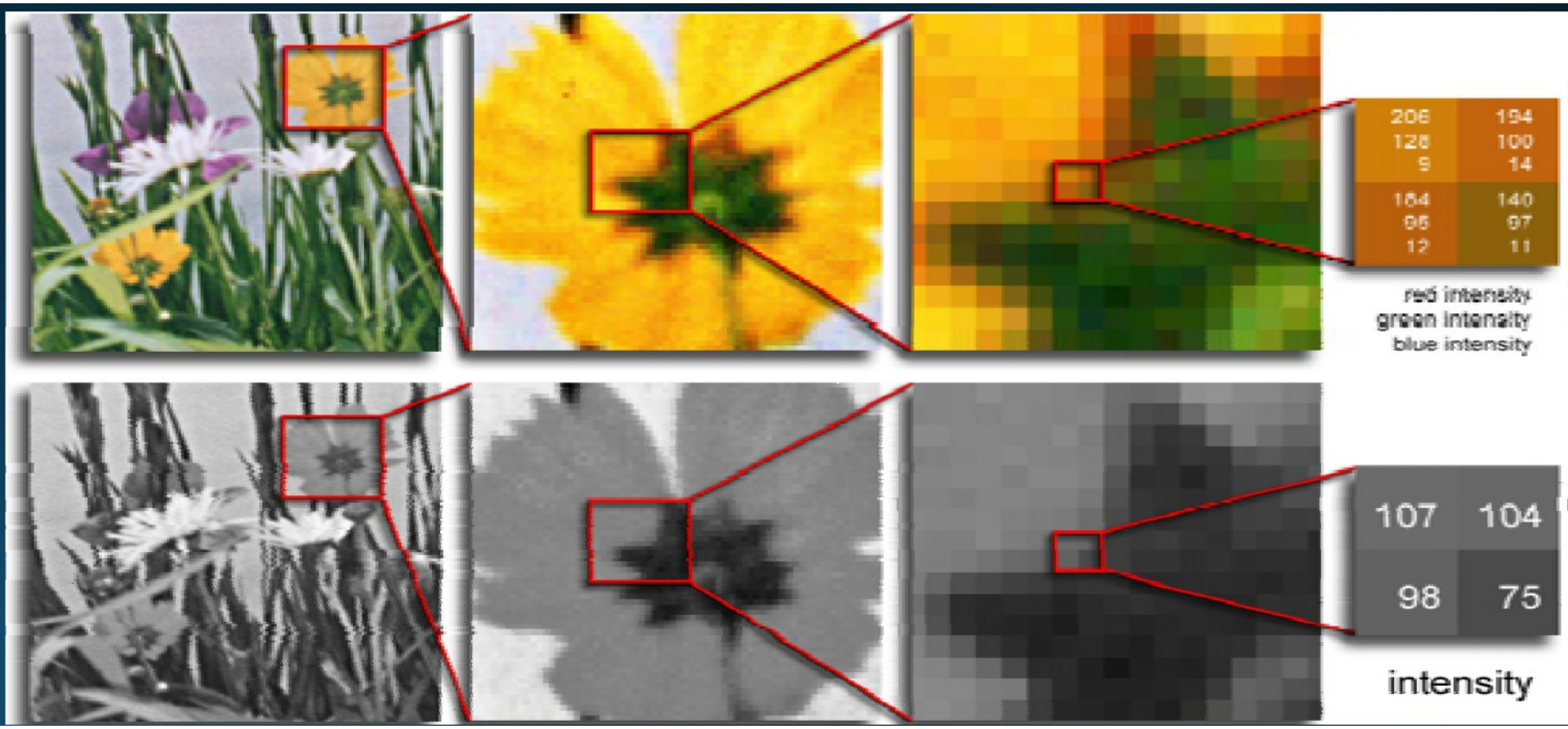
$1{,}97\ palce \times 300\ DPI = 590\ px$

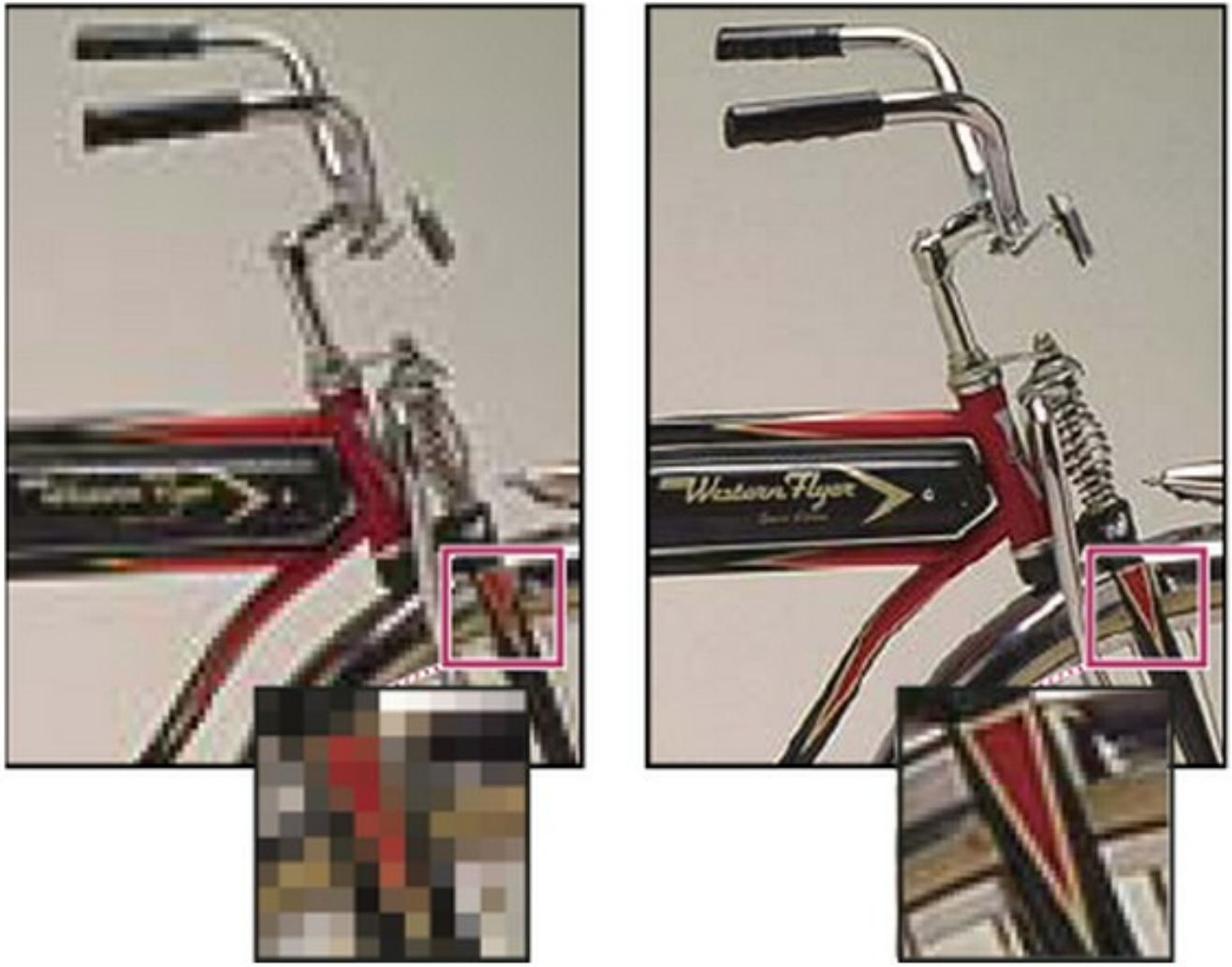
Druhý výsledek by nám vyšel, když bychoch počítali s kvalitou 600 *DPI*

$3{,}94\ palce \times 600\ DPI = 2364\ px$

$1{,}97\ palce \times 600\ DPI = 1.182\ px$

Jednalo by se o velmi kvalitní tisk,
ale lidské oko tuto kvalitu jen těžko rozezná.


206 194
126 100
9 14
154 140
95 97
12 11
red intensity
green intensity
blue intensity
107 104
98 75
intensity



Same image at 72-ppi and 300-ppi; inset zoom 200%

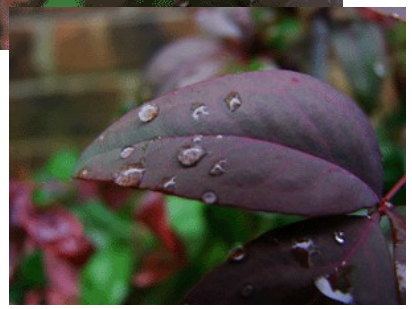
Barevná hloubka

- popisuje počet bitů použitých k popisu určité barvy nebo pixelu v bitmapovém obrázku nebo rámečku videa
- počet bitů na pixel (zejména je-li uvedeno spolu s počtem použitých pixelů)
- větší barevná hloubka zvětšuje škálu různých barev a přirozeně také paměťovou náročnost obrázku či videa

1 bit
2 barvy

2 bity
4 barvy

4 bity
16 barev



8 bitů
256 barev

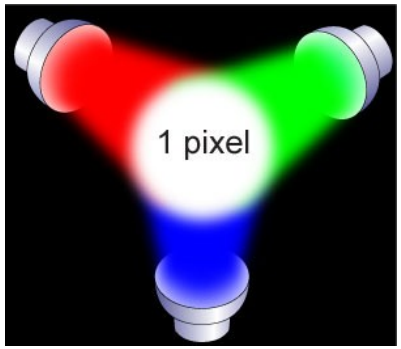
Používané barevné hloubky

- **1**bitová barva (2^1 = 2 barvy): Mono Color (nejpoužívanější je, že bit 0 = černá = a bit 1 = bílá)
- **4**bitová barva (2^4 = 16 barev)
- **8**bitová barva (2^8 = 256 barev)
- **15**bitová barva (2^{15} = 32 768 barev): jako **Low Color**
- **16**bitová barva (2^{16} = 65 536 barev): **High Color**
- **24**bitová barva (2^{24} = 16 777 216 barev): **True Color**
- **32**bitová barva (2^{32} = 4 294 967 296 barev): **Super True Color** (někdy také jako **True Color**)
- **48**bitová barva (2^{48} = 281 474 976 710 656 = 281,5 biliónů barev): **Deep Color**

Lidské oko: dokáže od sebe odlišit až čtyři miliardy různých odstínů.

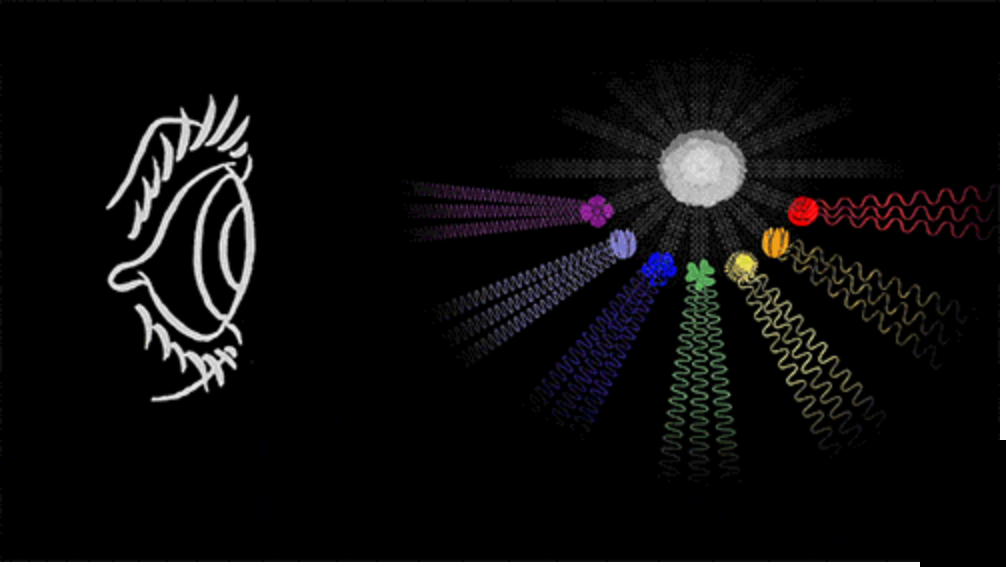
Barevné kanály

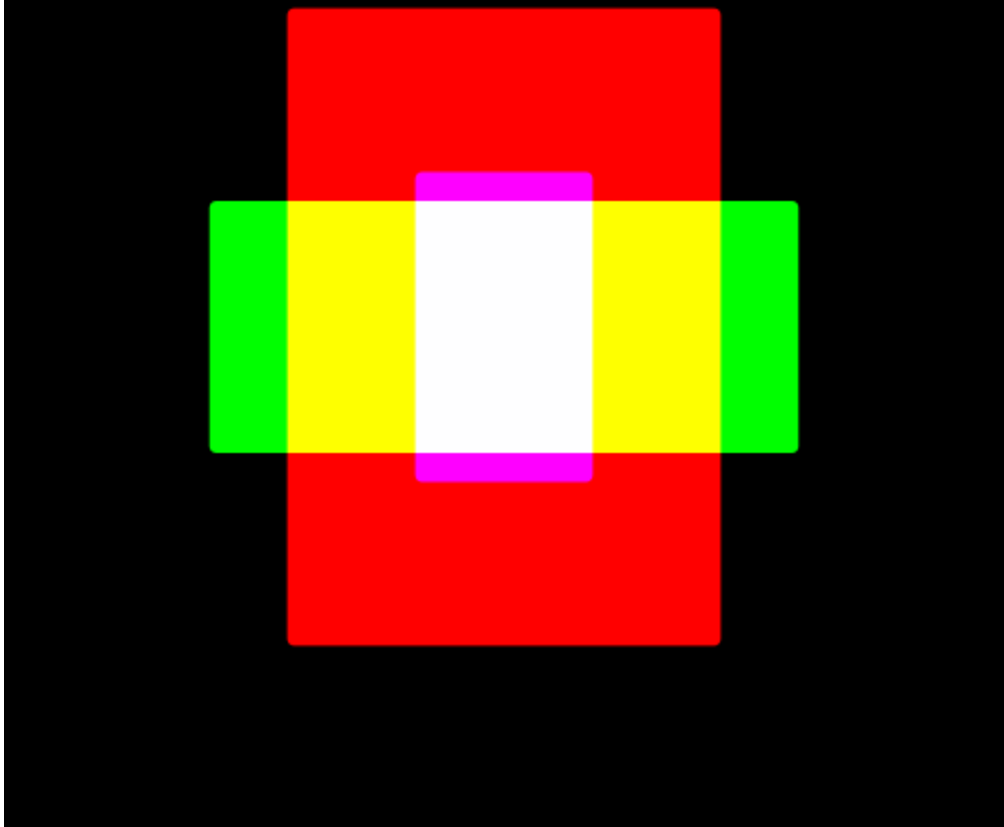
- K zobrazení celého přirozeného barevného spektra jsou potřeba tři základní barvy.
- **RGB** neboli **červená-zelená-modrá je aditivní způsob míchání barev** používaný ve všech monitorech a projektorech (jde o míchání vyzařovaného světla), tudíž nepotřebuje vnější světlo (monitor zobrazuje i v naprosté tmě)
- **CMYK (žlutá, azurová, purpurová)** je barevný model založený **na subtraktivním míchání barev** (mícháním od sebe barvy odčítáme, tedy omezujeme barevné spektrum, které se odráží od povrchu). CMYK se používá především u reprodukčních zařízení, která barvy tvoří mícháním pigmentů (např. inkoustová tiskárna)



RGB

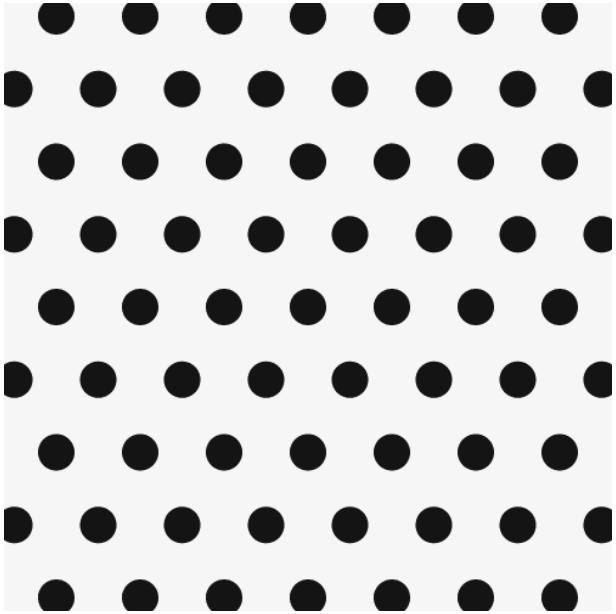
- *Pomocí tří základních barev RGB je možné smíchat všechny ostatní barvy. Svítí-li všechny tři mikroreflektory na maximum, vytvoří čistě bílou*

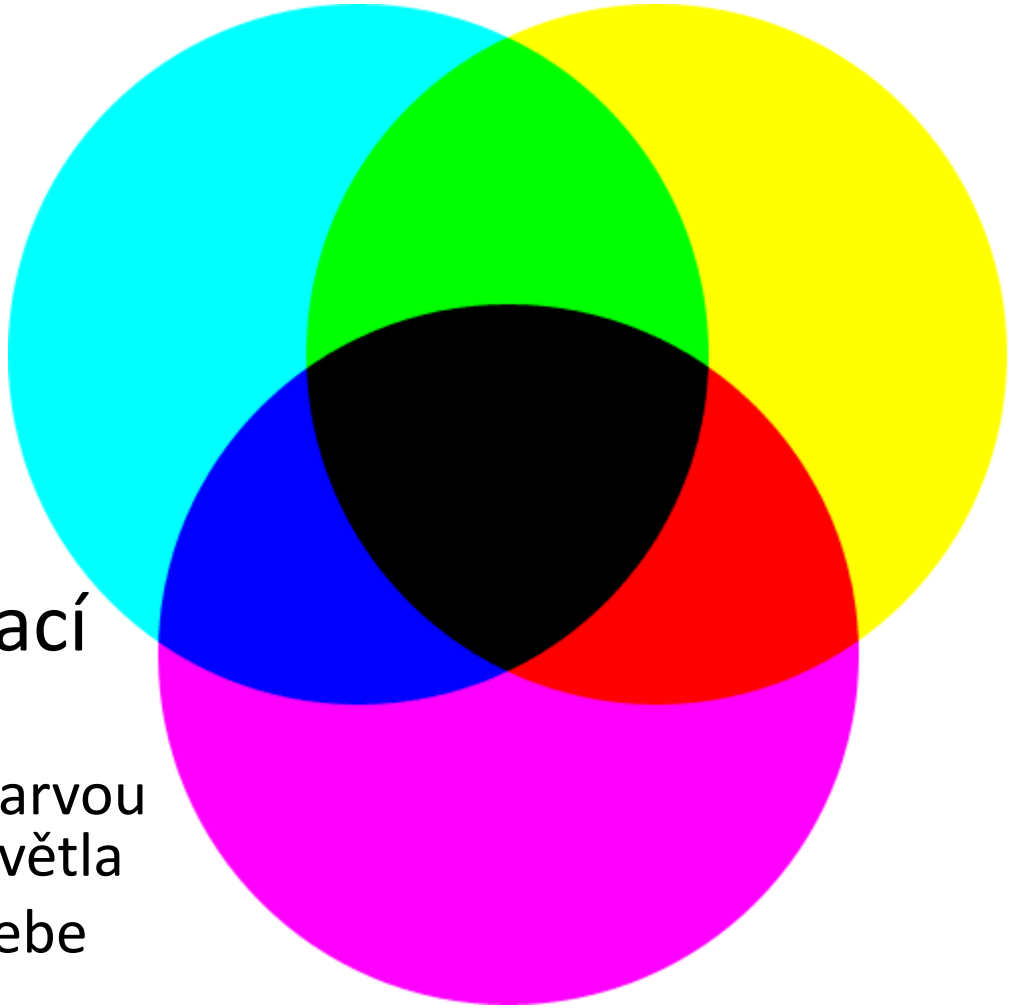




CMYK

azurová (Cyan); purpurová (Magenta); žlutá (Yellow); černá (Key - při soutisku CMYK barev se barvy zarovnávají na klíčovací značky, které jsou tištěny klasickou černou barvou)





- subtraktivní - odčítací míchání barev
- s každou další přidanou barvou se ubírá část původního světla
- Například: skládáme na sebe barevné filtry, mícháme pigmentové barvy

Metadata

- z řeckého *meta- = mezi, za* + latinského *data = to, co je dáno*
- strukturovaná data o datech
- Fotografie obvykle metadata ve formátu EXIF (informace o vzniku fotografie – datum a čas pořízení, použitá ohnisková vzdálenost, použití blesku, typ a výrobce fotoaparátu apod.)

RAW

- RAW je pravděpodobně **nejkvalitnější** formát pro ukládání digitálních fotografií, je bezztrátový a nekomprimovaný.
- Pokud však chcete zobrazit snímek uložený v RAWu, neobejdete se bez počítače.
- Obrovskou výhodou formátu je prakticky neomezená možnost úprav od volby vyvážení bílé, až po „vytáhnutí kresby“ z podexponovaných míst snímku.
- Po všech úpravách je nutné RAW tzv. vyvolat a uložit snímek v jiném formátu.
- Je vhodný pouze pro digitální fotografie.
- Zajímavostí je, že prakticky každý výrobce digitálních fotoaparátů má tento formát pojmenovaný jinak, respektive používá jinou koncovku pro jeho označení – NEF, ORF, RAF a další
- Více na: http://digiarena.e15.cz/formaty-obrazku_5#utm_medium=selfpromo&utm_source=digiarena&utm_campaign=copylink

TIFF (Tagged Image File Format)

- Nejčastěji se TIFF používá pro fotografie určené k tisku.
- Je to bezztrátový formát, který ukládá obrázky v barevné hloubce 24 bitů, což odpovídá přibližně 16,7 milionům barev.
- Nevýhodou je jeho velký datový objem a také to, že se nezobrazí v internetovém prohlížeči.
- Často se tento formát používá jako výstupní při vyvolávání z RAWu, následně se pak ještě převádí do JPEGu pro potřeby prezentace na webu.
- Více na: http://digiarena.e15.cz/formaty-obrazku_5#utm_medium=selfpromo&utm_source=digiarena&utm_campaign=copylink

JPEG (*Joint Photographic Experts Group*)

- Nejrozšířenější formát nejen pro fotografie, ale pro veškeré obrázky.
- Zobrazí ho každý prohlížeč.
- Jedná se o ztrátový formát, výsledná kvalita obrázku závisí na míře komprese.
- Obrázky se ukládají také ve 24bitovém barevné prostoru, jsou však komprimované.
- Při kompresi větší jak 50 procent je patrná ztráta kvality obrazu.
- Více na: http://digiarena.e15.cz/formaty-obrazku_5#utm_medium=selfpromo&utm_source=digiarena&utm_campaign=copylink

GIF (Graphics Interchange Format)

- je grafický formát určený pro rastrovou grafiku
- používá **bezeztrátovou kompresi** LZW84, na rozdíl například od formátu JPEG, který používá ztrátovou kompresi
- vhodný pro uložení tzv. pérovek (nápisy, plánky, loga)
- umožňuje také jednoduché animace
- velké omezení — maximální počet současně použitých barev barevné palety je 256 (8 bitů), v případě animace pak umožňuje využít odlišné palety 256 barev pro každý snímek

(Toto omezení nemá formát PNG, který se hodí ke stejným účelům jako GIF a nabízí pro většinu obrazů výrazně lepší kompresi)

Formát PNG však neumožňuje animace (ty umožňuje až APNG a MNG)

Formát GIF se stejně jako formáty PNG a JPEG používá pro WWW grafiku na Internetu.

PNG (Portable Network Graphics)

- je podobně jak GIF vhodný pro obrázky nikoliv pro fotografie
- Byl vytvořen jako nástupce GIFu, což s sebou nese i několik zlepšení.
- PNG není omezen na 256 barev, je možné použít až 24bitovou barevnou hloubku (16,7 miliónů barev) – odtud také dělení formátu na PNG-8 a PNG-24.
- Oproti GIFu je datově náročnější a nepodporuje animace.
- Setkáte se s ním především u grafiky nebo statických screenshotů.
- Při větších barevných plochách je vhodnější použít formát JPEG, neboť v PNG je výsledný obrázek několikrát datově větší.
- Více na: http://digiarena.e15.cz/formaty-obrazku_5#utm_medium=selfpromo&utm_source=digiarena&utm_campaign=copylink

BMP (Windows Bitmap) nebo také DIB (device-independent bitmap)

- Jeden z nejstarších formátů pro ukládání obrázků.
- Formát je nekomprimovaný a pracuje s barevnou hloubkou 24bitů.
- V současné době už se prakticky nepoužívá, nahradily ho ostatní zmíněné formáty.
- Více na: http://digiarena.e15.cz/formaty-obrazku_5#utm_medium=selfpromo&utm_source=digiarena&utm_campaign=copylink

Expozice

- proces vystavení světla dopadajícího na film nebo senzor, tak jeho celkové množství.
- Expozice se měří v EV (exposure value, expoziční stupeň).
- Správná expozice je určena citlivostí filmu či senzoru, měřenou na stupnici ISO a ovlivňována nastavením clony a rychlosti závěrky fotoaparátu.
- pro dosažení stejné expozice je při větším otevření clony nutno zkrátit čas a naopak

Expoziční čas

- doba expozice, rychlost závěrky
- doba, po kterou je závěrka fotoaparátu otevřena a umožňuje tak světlu dopadat na obrazový senzor nebo film ve fotoaparátu
- Doba expozice může (negativně nebo naopak kreativně) ovlivnit podobu těch částí snímky, které se v době expozice pohybují.
- Příliš dlouhá doba expozice způsobí jejich rozmazání, velmi krátká doba expozice naopak jejich „strnutí“ v čase.

Citlivost

- jeden ze tří základních parametrů určující expozici výsledného snímku. Zbylé dva jsou clona a expoziční čas
- Dvojnásobná citlivost snižuje potřebný expoziční čas na polovinu.
- Citlivost má v praxi vliv na kvalitu fotografie – způsobuje větší šum.

ISO 100
ISO 80
ISO 200
ISO 100
ISO 400
ISO 200
ISO 800
ISO 400
ISO 1600
ISO 800

Mikrofotografie -

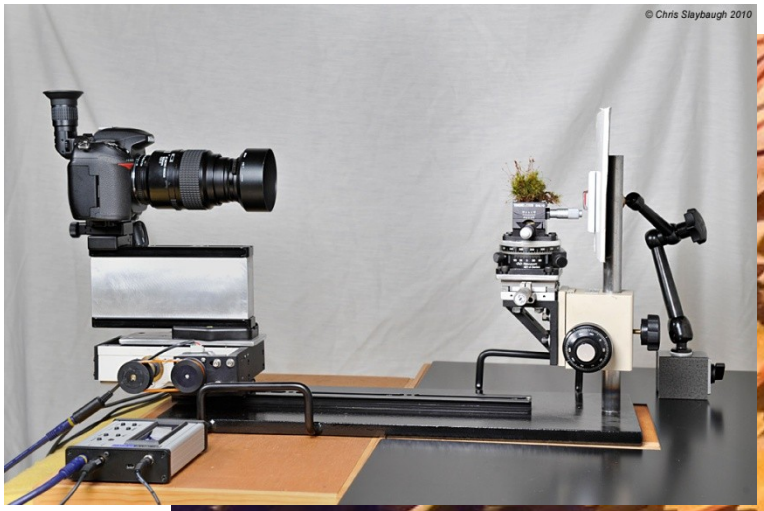
Fotodokumentace:

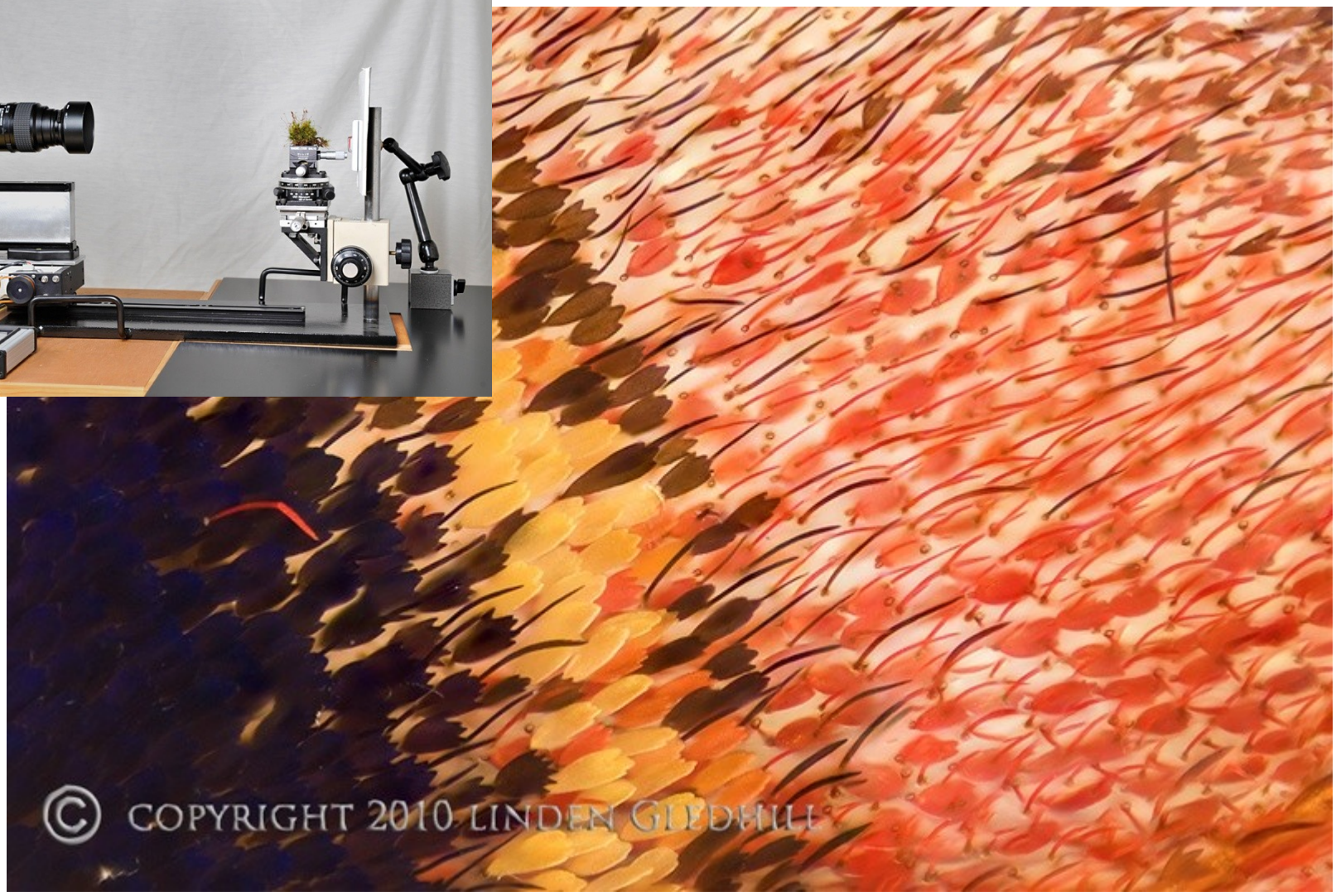
***Vícenásobné grafické zarovnání* (MIA) a *Rozšířené fokální zobrazení* (EFI) v digitální analýze obrazu (Stream Motion) + další vychytávky**

Mimo stream: Skládání obrazu – různě ostrých vrstev

- Focus stacking (hyperfocus)
- Různými programy: Adobe Photoshop, Extended Depth of Field (plugin pro ImageJ), Tufuse

Objektiv 10x, 39 složených obrázků, foceno po krocích o velikosti 0,01 mm pomocí StackShot





Instant Extended Focus Image (EFI)

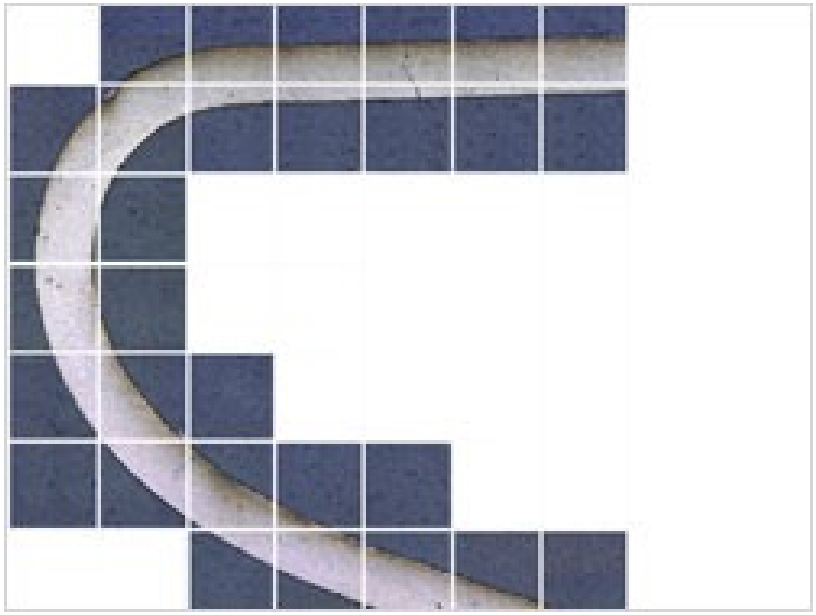
- OLYMPUS Stream software poskytuje obraz i vzorků, které přesahují standardní hloubkou ostrosti
- Jemným ostřením skládání obrazu v ose Z

EFI (Instant Extended Focus Image)

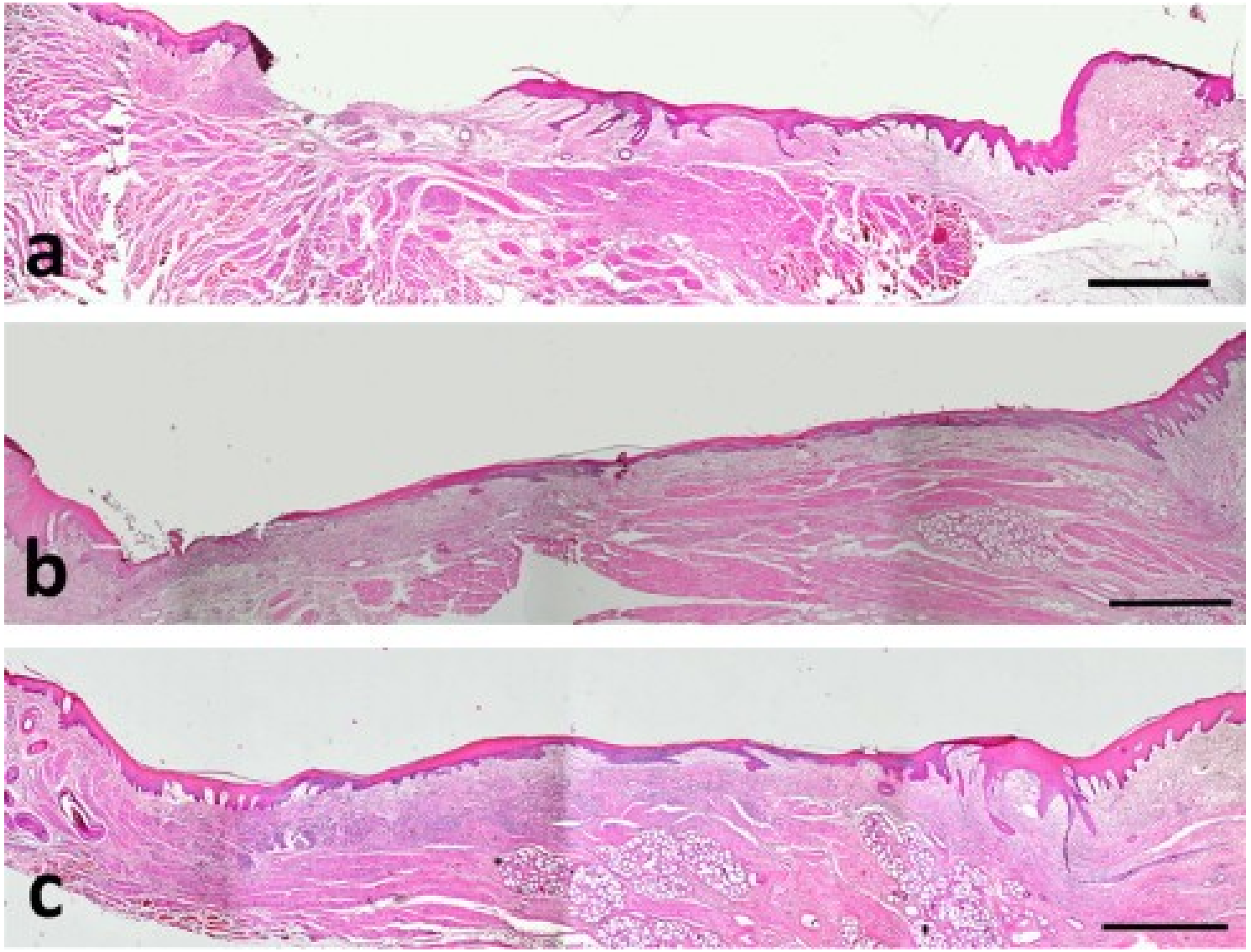
- iEFI poskytuje obraz s nekonečnou hloubkou ostrosti, i když je Z-posun nemotorizovaný
- Uživatel zaměřuje ostrost prostřednictvím ostřícího šroubu ve všech úrovních shora dolů (nebo naopak)

Manual Multiple Image Alignment (MIA)

- vytváření panoramatických snímků vzorků, které přesahují zorné pole
- výstup připraven pro snadnou vizualizaci nebo komplexní měření



Obrazy získané použitím většího počtu obrázků zarovnaných (MIA) softwarem



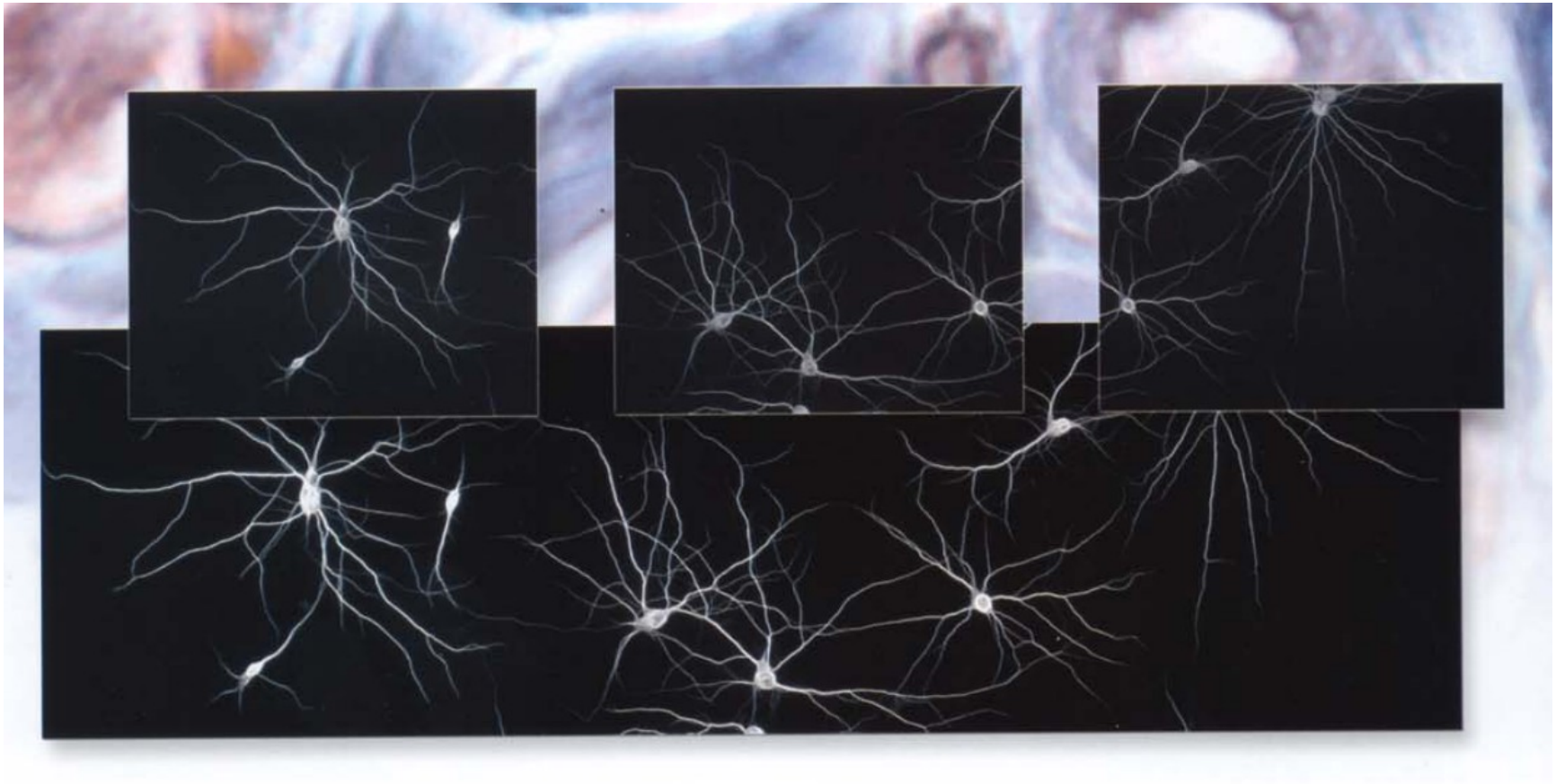
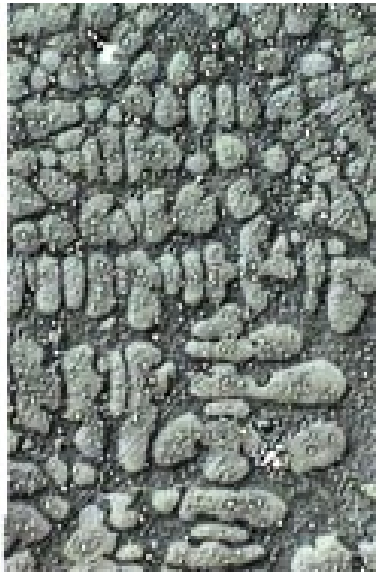
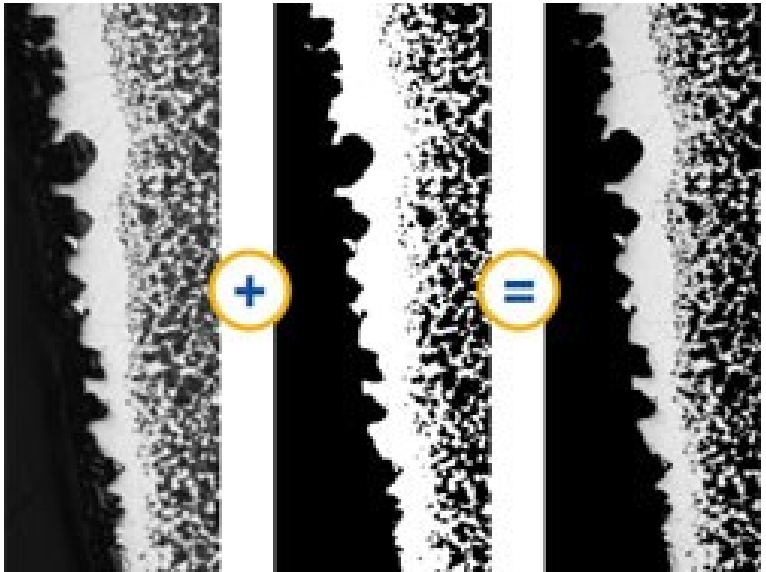


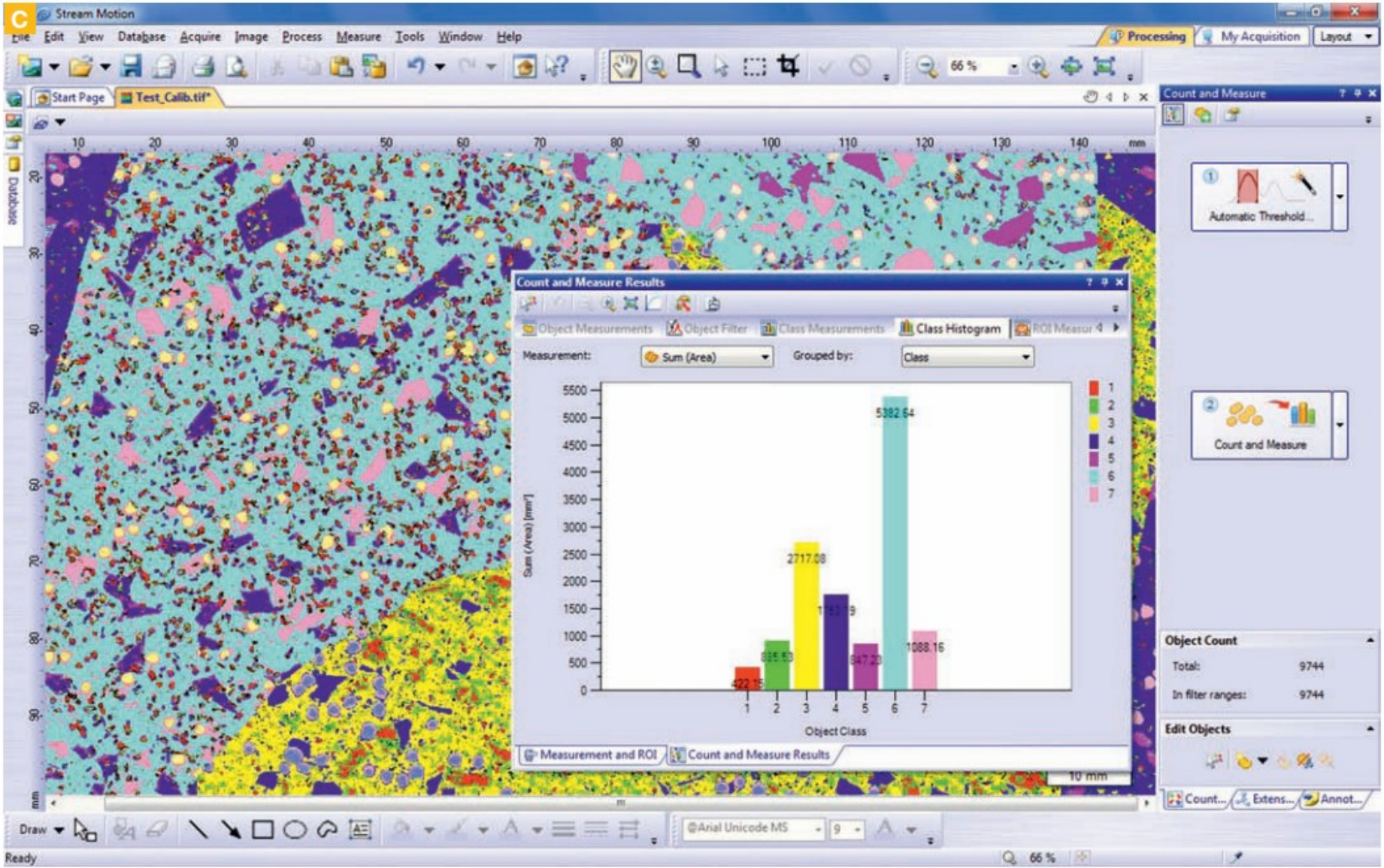
Image Processing - Zpracování obrazu

- OLYMPUS Stream má řadu filtrů pro detekci hran, vyhlazení aj.
- Lze vizualizovat určité znaky zvýšením a modifikací obrazu různými filtry
- Před změnou je dobré použít náhled na změnu
- Manipulace s obrazem lze dělat i bez ztráty původního obrazu
- (Enhancement of contrast by DCE filter)





Detekce a klasifikace objektů

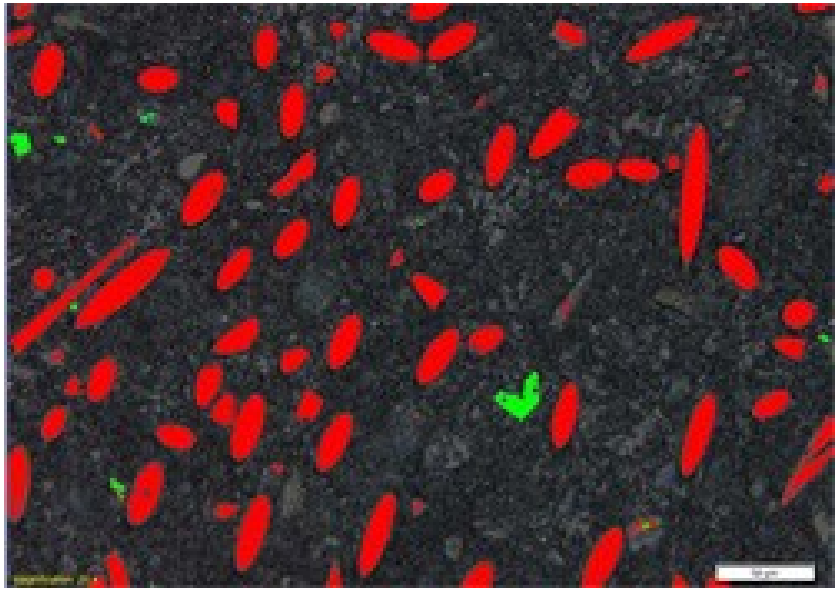


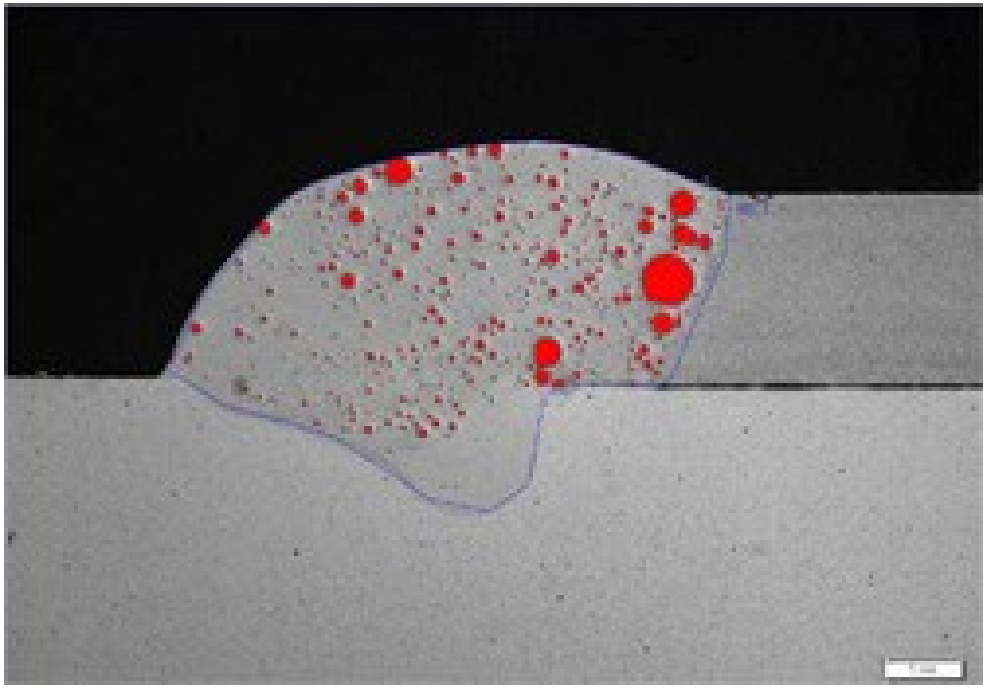
Detekce a klasifikace objektů

- 50 různých parametrů pro geometrické (tvar, velikost, poloha) a pixelové vlastnosti (intenzita, hodnota šedé)
- Parametry mohou být kombinovány přes logické a aritmetické operace s cílem vytvořit třídy objektů
- Po ručení tříd může Stream automaticky získávat velmi podrobné informace o jednotlivých objektech
- diagram - počet objektů v každé třídě
- další zpracování a analýza – export tabulky do aplikace Microsoft Excel

Detekce objektů

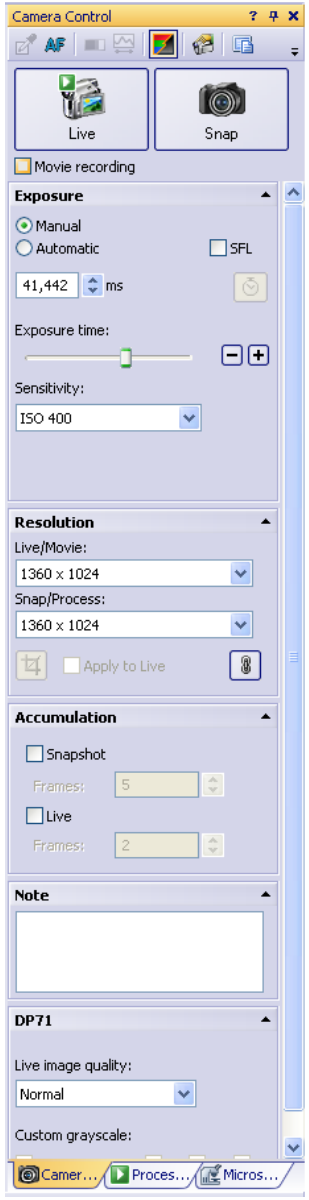
- Region Of Interest (ROI) + thresholds (hranice)
- Lze odlišit automaticky trojúhelníky, kruhy, obdélníky a mnohoúhelníky





Jak natočit video v motion stream:

- Zatrhnout



Uložení souboru

- Uložení souboru najdeme v rozbalovací nabídce „File“
- Výsledné video bude mít příponu AVI
- neukládat .vsi (neotevřeli byste to v normálním programu)

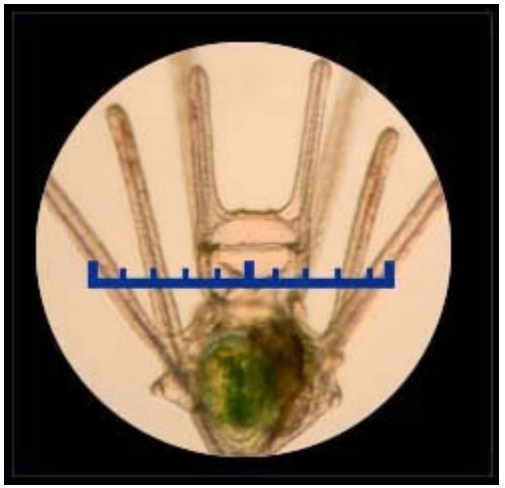
Klasická morfometrie

Měření délek, plochy, obvodu, počtu v digitální analýze obrazu Stream Motion

Úvod – co vše jde proměřit

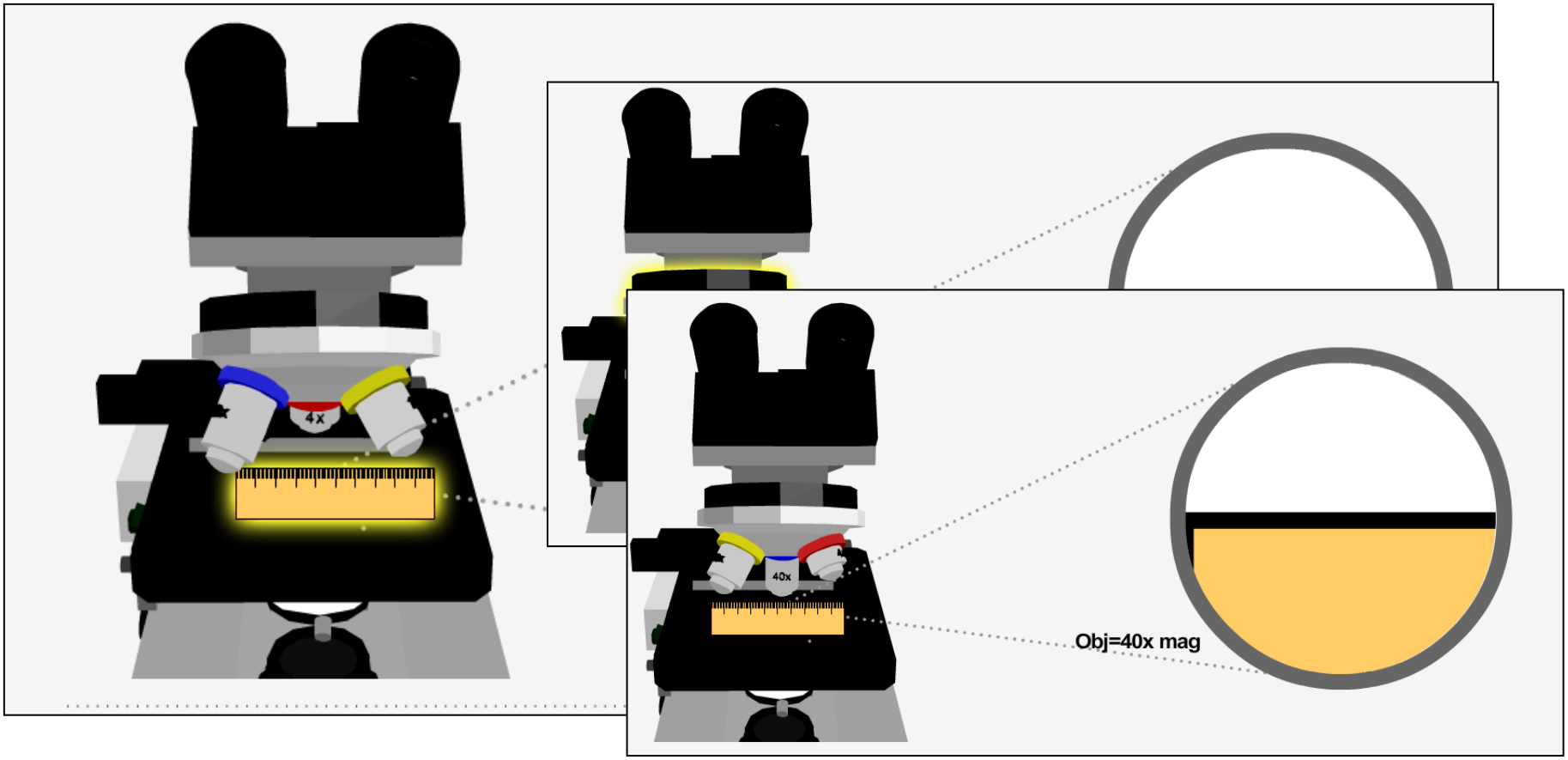
- Rychlé počítání objektů
- Měření úseků i ploch
- Měření lze uložit
- Kalibrace obrázků při správném nastavení objektivu
- Pokud není obrázek
- zkalibrován pak:

„Image > Calibrate Image“



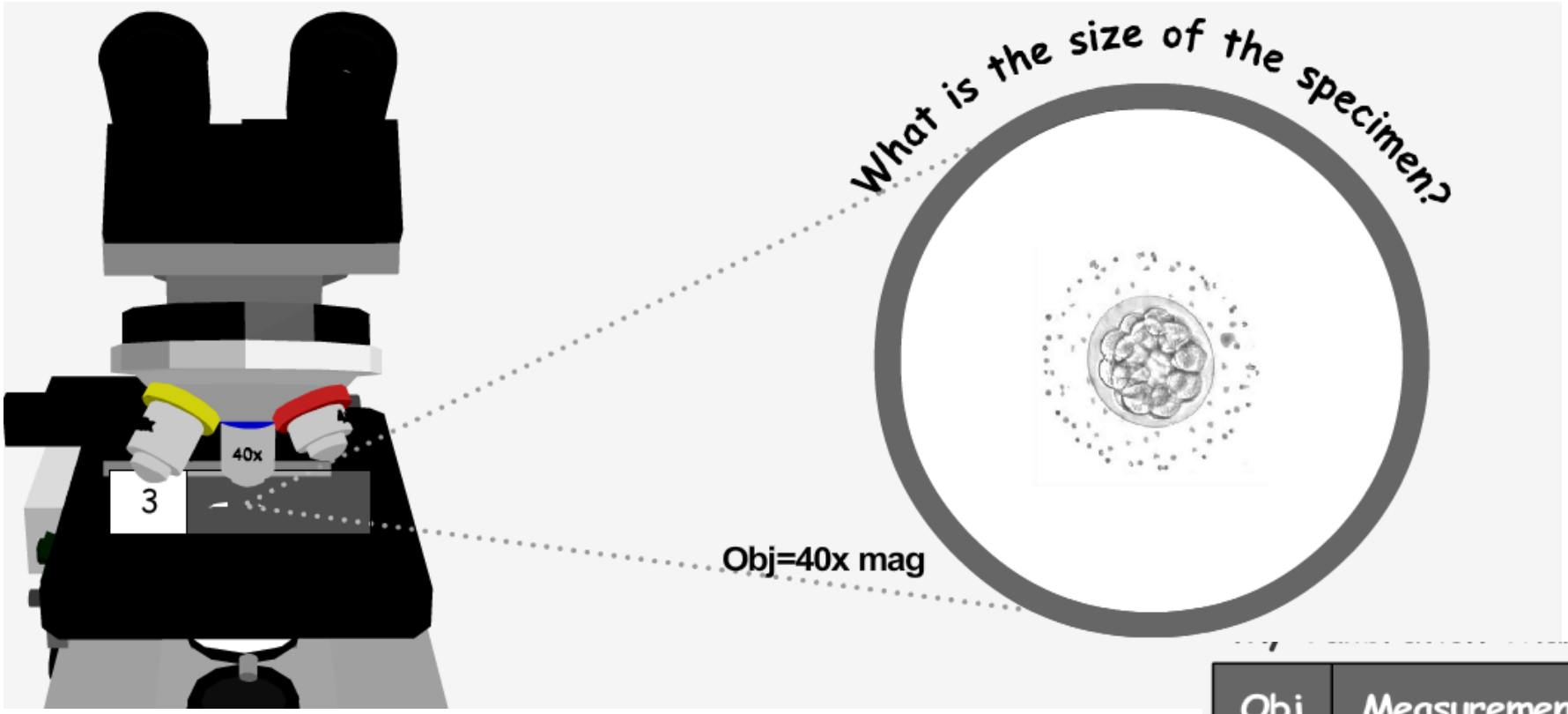
Kalibrace a měření školním mikroskopem

- Protože velikost objektů v pozorovaném poli je při každém zvětšení jiná
- Každý mikroskop se musí kalibrovat zvlášť, každý je jiný
- Nejjedonušíš je změřit zorné pole – pak lze snadno odhadnout skutečnou velikost pozorovaného objektu



- Obj. 4x – 4,5 mm
- Obj. 10x – 2 mm
- Obj. 40x – 0,5 mm

Odhad velikosti



Obj	Measurement
4x	4.5 mm
10x	2 mm
40x	0.5 mm

- 0.1 mm

Vyzkoušejte si zde:
http://virtualurchin.stanford.edu/microscope.htm

Výběr prostředí pro měření

- Přepnout do rozvržení "Processing„
- Nástroj *Measurement and ROI*
- Aktivní i v živém obraze!!! - Výhoda Motion Stream
- Aktivace měření *Measurement and ROI*

tlačítkem *Select Measurement Objects*